



北海道公立大学法人  
**札幌医科大学**  
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	ER $\alpha$ increases endometrial cancer cell resistance to cisplatin via upregulation of BAG3 (ER $\alpha$ はBAG3のアップレギュレーションを介して子宮体癌細胞のシスプラチンへの耐性を増強する)
Author(s) 著者	阿部, 秀悦
Degree number 学位記番号	甲第3129号
Degree name 学位の種別	博士(医学)
Issue Date 学位取得年月日	2021-03-31
Original Article 原著論文	Oncol Lett. 2021 Jan;21(1):20
Doc URL	
DOI	10.3892/ol.2020.12281
Resource Version	Author Edition

## 学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 1 4 9 6 号	氏 名	阿部 秀悦
<p>論文題名</p> <p>ER<math>\alpha</math> increases endometrial cancer cell resistance to cisplatin via upregulation of BAG3 (ER<math>\alpha</math>は BAG3 のアップレギュレーションを介して子宮体癌細胞のシスプラチンへの耐性を増強する)</p> <p>研究目的</p> <p>子宮体癌は、世界の女性での診断数は全癌種中 6 位、死亡数は 14 位の癌であり、子宮体癌の発生率は近年増加している。子宮体癌の 80%以上がエストロゲンに関連しており、これは子宮体癌の発生率の上昇が、外因性エストロゲン使用の増加および内因性エストロゲンへの子宮の暴露の増加（未産、妊娠の減少、初潮年齢の低下、肥満等）に関連している可能性があることを示唆している。</p> <p>エストロゲンは核内のエストロゲン受容体（ER）に結合して効果を現すが、ER はエストロゲンに結合した後に標的遺伝子の転写を調節するリガンド依存性転写因子である。ER は 2 つの別の遺伝子によってコードされており、その産物はエストロゲンレセプター<math>\alpha</math>（ER<math>\alpha</math>）とエストロゲンレセプター<math>\beta</math>（ER<math>\beta</math>）である。ER<math>\alpha</math>は特定の子宮体癌および乳癌で高度に発現することが知られており、細胞の増殖、アポトーシス、分化に関する遺伝子の発現を調節する役割を果たすと考えられている。ER<math>\alpha</math>の活性化は細胞増殖を促進し、化学療法に対する卵巣癌細胞の感受性を低下させることが知られている。</p> <p>BCL-2 関連アタノゲン 3（BAG3）は、増殖、アポトーシス、接着、遊走などの細胞機序に関与していると報告されるストレス誘発性抗アポトーシスタンパクである。我々は以前の研究で、子宮体癌細胞株で BAG3 が microRNA-29b（miR-29b）のダウンレギュレーションを通じて細胞遊走と浸潤性を増強することを示した。Felzen らは、ヒト神経芽腫細胞株において ER<math>\alpha</math> 発現細胞が ER<math>\alpha</math> 非発現細胞と比べて高レベルのオートファジー活性を示し、ER<math>\alpha</math> が BAG3 の関与している非標準的オートファジー経路を調節していることを示した。また Brendel らは、ER<math>\alpha</math> 発現ヒト神経芽腫細胞が ER<math>\alpha</math> 非発現ヒト神経芽腫細胞と比べて高レベルの BAG3 発現を示し、さらにアポトーシスへの耐性を獲得していることを示した。</p> <p>microRNA (miRNA)は、発癌時に様々な役割を果たし、癌抑制遺伝子または癌遺伝子として機能する小さな non-coding RNA である。miRNA の 1 つである miR-29b は抗アポトーシス活性を持つタンパク質である Mcl-1 のアップレギュレーションを介して抗癌剤およ</p>			

びアポトーシスへの耐性の獲得に寄与していることが知られている。

我々は子宮体癌細胞株における ER $\alpha$  と BAG3 の関係に注目し、ER $\alpha$ 、BAG3、miR-29b、さらにその下流に位置する Mcl-1 の関係に焦点を当てた。我々の研究は、子宮体癌細胞における ER $\alpha$  と BAG3 の関係と機能への新たな知見を提供するものである。

## 研究方法

ER $\alpha$  発現細胞として類内膜癌 Grade 1 の Ishikawa 細胞株、ER $\alpha$  非発現細胞として子宮癌肉腫の EMTOKA 細胞株を主に研究材料として用いた。培養した Ishikawa 細胞および EMTOKA 細胞に pcDNA vector を用いて ER $\alpha$  遺伝子とそのコントロールをトランスフェクトし、リアルタイム qRT-PCR、Western blotting、microRNA のリアルタイム qRT-PCR、シスプラチンへの耐性を検討する XTT 細胞生存アッセイを行い、コントロール群と ER $\alpha$  高発現群とを比較した。

## 研究成績

Ishikawa 細胞および EMTOKA 細胞の両方で ER $\alpha$  の過剰発現により mRNA レベルでの BAG3 発現の上昇を認めたが、タンパク質レベルでは EMTOKA 細胞では ER $\alpha$  の過剰発現により BAG3 発現の有意な上昇を認めたが、Ishikawa 細胞では有意差を認めなかった。

EMTOKA 細胞では ER $\alpha$  の過剰発現により、miR-29b の有意な発現低下を認めたが、Ishikawa 細胞では有意差を認めなかった。

さらにその下流タンパクである Mcl-1 に関しても、EMTOKA 細胞では ER $\alpha$  の過剰発現により有意な発現上昇を認めたが、Ishikawa 細胞では有意差を認めなかった。

最後に、シスプラチンに対する化学療法感受性に対する ER $\alpha$  過剰発現の影響について検討した。EMTOKA 細胞においてはシスプラチンに 48 時間暴露した後に生存している細胞数は、ER $\alpha$  過剰発現群が対照群と比較し有意に多いことを示したが、Ishikawa 細胞では ER $\alpha$  過剰発現がシスプラチンの存在下での生存率に影響を与えないことを示した。

## 考察

エストロゲンは発癌に関連し、子宮体癌の進行を促進することが知られている。たとえば、子宮内体癌患者のマクロファージ上の ER $\alpha$  発現は、癌の進行と正の相関があることが知られている。さらに卵巣癌細胞では、ER $\alpha$  の活性化は抗アポトーシスタンパク質の発現増加を介してプラチナ耐性を誘発することが知られている。今回の我々の結果は、ヒト子宮体癌細胞 EMTOKA における ER $\alpha$  発現がアポトーシス、細

胞分化の調節に重要な役割を果たす BAG3 のアップレギュレーションを介して、シスプラチンの存在下での細胞生存率を高めることを示唆している。また、外因性 ER $\alpha$  過剰発現による効果は、ER $\alpha$  を内因的に発現する Ishikawa 細胞では認められず、内因的に ER $\alpha$  を発現しない EMTOKA 細胞でのみ見られたことは特徴的である。Felzenらはヒト神経芽腫細胞株において ER $\alpha$  の過剰発現が BAG3 発現の増強を介しオートファジー活性を増加させることを示したが、ER $\alpha$  発現ヒト乳癌細胞株である MCF7 細胞では、ER $\alpha$  をノックダウンさせても BAG3 発現レベルおよびオートファジー活性レベルに有意差を認めなかった。我々の追加実験での結果もまた、Ishikawa 細胞における ER $\alpha$  発現のノックダウンが BAG3 発現レベルに影響を与えないことを示している。これは、わずかな ER $\alpha$  発現が ER $\alpha$  シグナル伝達経路の下流メディエーター (BAG3、Mcl-1 等) の発現を増強するのには十分であり、ER $\alpha$  発現のレベルのさらなる増強によってこれらのタンパク質の発現の増強が起こり得ないことを示唆している。

また miR-29b は腫瘍抑制因子として作用すると言われているが、さらに Mcl-1 を抑制しそれによって細胞のアポトーシスを促進することが知られている。本研究では、ER $\alpha$  の過剰発現が miR-29b の発現を低下させ、さらに Mcl-1 の発現を増強させることを示した。我々は以前の研究で、BAG3 の過剰発現が、miR-29b の発現低下およびそれに続く MMP-2 の発現上昇を介して腫瘍細胞の運動性および浸潤性を増加させることを示した。また卵巣癌細胞において BAG3 が miR-29b を抑制し、Mcl-1 を発現増強させることで、抗癌剤耐性を誘導することも示している。これらの以前の研究結果と一致して、ER $\alpha$  が ER $\alpha$ -BAG3-miR-29b-Mcl-1 経路を介して子宮体癌細胞における抗癌剤に対する耐性の獲得に寄与している可能性が高いことを示している。

## 結論

これらの結果は、ER $\alpha$  が一部の子宮体癌細胞のシスプラチンに対する反応性の重要な決定因子であり、ER $\alpha$  が一部の種類の子宮体癌の治療に潜在的に有用な治療標的であることを示唆している。

## 論文審査の要旨及び担当者

(令和3年3月31日授与)

報告番号	甲第1496号	氏 名	阿部 秀悦
論文審査 担 当 者	主査 齋藤 豪 教授	副査 鳥越 俊彦 教授	
	副査 長谷川 匡 教授	委員 小山内 誠 教授	

論文題名	ER $\alpha$ increases endometrial cancer cell resistance to cisplatin via upregulation of BAG3. (ER $\alpha$ はBAG3のアップレギュレーションを介して子宮体癌細胞のシスプラチンへの耐性を増強する)
結果の要旨	
<p>ER<math>\alpha</math>非発現子宮体癌細胞において、ER<math>\alpha</math>の過剰発現がBAG3発現の増強、miR-29b発現の減弱、Mcl-1発現の増強を介してシスプラチンに対する細胞生存能の増強に関与していることが示唆された。</p> <p>以上より本研究は子宮体癌に対する治療標的の選択肢を広げる一助となり、子宮体癌の病態解明および治療への応用が期待されるものであり、審査委員全員より学位授与に値すると認められた。</p>	